



Espacenet

Bibliographic data: JP 55156592 (A)

PREPARATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCE* GENTAMICIN C1A

Publication date: 1980-12-05
Inventor(s): FUJII TADAYO; SATOI SHYUZO; MUTOO NAOKI; KODAMA AKIRA; KOTANI MASARU ±
Applicant(s): TOYO JOZO KK ±
Classification:
 - **International:** A61K35/74; C12P1/06; C12R1/01; (IPC1-7) C12P1/06; C12R1/01
 - **European:**
Application number: JP19790060021 19790515
Priority number(s): JP19790060021 19790515
Also published as:
 • JP.61022955 (B)
 • JP.1355899 (C)

Abstract of JP 55156592 (A)

PURPOSE: To prepare an antibiotic substance, gentamicin C1a, by culturing gentamicin C1a-producing fungi belonging to Dactylosporangium genus. **CONSTITUTION:** Fungi capable of producing an antibiotic substance, gentamicin C1a, and belonging to Dactylosporangium genus, e.g. Dactylosporangium thalassense G367, etc. are cultured in a conventional culturing medium at 25-35 deg.C for 100-200hr under aeration, and after adjusting the pH of the cultured medium to acidic range, the medium is neutralized and filtered to obtain the filtrate of the cultivation products. The filtrate is treated with an anion exchange resin, the adsorbed active substance is eluted with 2N aq. ammonia, and the eluate is concentrated, adjusted on pH, and treated with an anion exchange resin.; The adsorbed material is eluted with aq. ammonia having concentration gradient extending over 0 and 0.35N, and the active fraction is concentrated under reduced pressure, and freeze-dried to obtain the objective antibiotic substance, gentamicin C1a

Last updated: 04 04 2011 Worldwide Database 5.7.20, 62p

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—156592

⑬ Int. Cl.³
C 12 P 1/06
C 12 R 1/01

識別記号

庁内整理番号
6760—4B

⑭ 公開 昭和55年(1980)12月5日

発明の教 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑮ 抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法

⑯ 特 願 昭54—60021

⑰ 出 願 昭54(1979)5月15日

⑱ 発 明 者 藤井忠代
三島市光ヶ丘15の4

⑲ 発 明 者 里井秀三
静岡県田方郡函南町柏谷1277の
28

⑳ 発 明 者 武藤直紀

静岡県田方郡大仁町三福685

㉑ 発 明 者 児玉章
静岡県田方郡函南町平井1900の
3

㉒ 発 明 者 小谷勝
静岡県田方郡大仁町田家727の
3

㉓ 出 願 人 東洋醸造株式会社
静岡県田方郡大仁町三福632の
1

要 約

1. 発明の名称

抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) グラチス・ボランシウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌を増殖培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシンC1aを採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法。

(2) グラチス・ボランシウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌が、グラチス・ボランシウム・タイランゲンセ G 567 である特許請求の範囲(1)項記載の抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、抗生物質ゲンタミシンC1a (Gentamicin C1a) の新規な製造法に関する。

従来より抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌として、ミクロモノスポラ・プルブレア (Micro-monopora purpurea; 特公昭44—21594号、

米特許第3891572号、Antimicrob- agents and chemother. 1963年1, 8, 14, 17および116)、ミクロモノスポラ・エチノスポラ (Micromonospora echinospora) およびその2変種(上記同一文献)、ミクロモノスポラ・サギ (Micromonospora sagamiensis) およびその2変種(特開昭49—42888号)、およびミクロモノスポラ・プルブレア・パリエスタ・ミグレンシヤス (Micromonospora purpurea var. nigrescens; ハンガリー国特許第168778号、J. Antibiot. 30: 945 (1977)) が知られていた。上記の通り、抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌は、すべてミクロモノスポラ属 (Micromonospora) に属するものであり、その形態的特徴は落生菌系に一個づつ胞子を形成するものであり、さらにミクロモノスポラ属はミクロモノスポラ科 (Micromonosporaceae) に属するものであつた (Bergey's manual of determinative bacteriology 第8版 (1974))。

本発明者らは、静岡県富士市の土壌より分

した放線菌G367株が炭水化物ゲンタミシンCに
を産生することを見出し、後述する通り、放線
菌G367株がダクトロスポランジウム属(
Dactylosporangium)に属するもので、その形態
的特徴は基性菌系に胞子のうを産生し、胞子のう
の中に鞭毛を有する胞子を形成するもので、さらに
このダクトロスポランジウム属はアクチノプラネ
ス科(Actinoplanaceae)に属するもので、従来の
ミクロモノスポリ属とは分類学上、明らかに科
の段階での相違が認められるもので、炭水化物ゲ
ンタミシンCの新族を生産菌であることを見い
出した。

また上記の放線菌G367株の菌学的諸特性は
以下の通りである。

〔Ⅰ〕 形態的特徴

リンゴ酸カルシウム寒天培地[Bact. Rev. 2]
: 1(1957)]上、30℃、3-7日間培養
し、観察した所見は次の通りである。

産生菌糸は曲線状または屈曲状で、分枝をなし
て伸び、分断はせず、直径0.5~0.8μであり、

- 3 -

気菌糸は形成しない。

芽生菌糸に、大きさ1.5~2.0×2.5μの球状
または棒状物体の産生が、寒天培地中に埋つた
状態でみられる。

芽生菌糸より短かい胞子のう柄を生じ、胞子の
うは球形で、寒天培地表面上に、1個または層状
に形成する。胞子のうの大きさは、1.0~1.5×
4.0~6.5μで、中に5~4個の胞子がたてに一
列に入っている。

胞子は水中で運動性があり、形は球形、棒内形
または棒裂形を呈し、大きさは1.0~1.5×1.5
~2.5μであり、極性で棒状の鞭毛を有している。

〔Ⅱ〕 ジアミノピノリン酸生成

全菌体分析によるジアミノピノリン酸は、ノゾ
ニ酸およびノゾニ型よりR=OHの低いもの(nlow
moving diaminopimelic acid)が検出された。

〔Ⅲ〕 各種培地における生育状態等

各種培地上で、30℃、14日間培養し、観察
した所見は次の通りであり、オート・ミール寒
天培地上で未発育の気菌糸がわずかに形成される

- 4 -

以外は、気菌糸の形成は認められず、また胞子の
うはリンゴ酸カルシウム寒天培地上で良好、土寒
天培地(J. gen. Microbiol. 50: 295(19
68))上で、中程度であり、その他の培地上で
はわずが、またほとんど形成されなかつた。

なお、色の表示は、カラー・ハーモニー・マニ
アル(Color Harmony Manual)第4版1958年
(Container Corporation of America)による
色の分類に従つたものである。

各種地植えにおける生育状態等

地 域	生育	葉 生 葉 糸 の 色	可 容 性 色 素
シメダナ・備前種地植え (ワタスマン地植え1)※	中程度ないし不良	アブリコト(Apricot(41a))ないしダスター・オレンジ (Dusty Orange(41c))	なし
グルコース・アスパラゲン地植え (ワタスマン地植え2)※	不良	ブライト・メロン・イエロー[Brite Melon Yellow (51a)]ないしアブリコト(41a)。	"
グリモリン・アスパラゲン地植え (15P地植え5)※※	僅少ないし不良	無色ないしライト・メロン・イエロー[Light Melon Yellow(5ea)]	"
スター・銀葉地植え (15P地植え4)※※	中程度ないし良好	ルセツト・オレンジ[Russet Orange(4nc)]ないし ダスター・オレンジ(41c)	"
ナロシ地植え (15P地植え7)※※	僅少ないし不良	アブリコト(Apricot(41a))ないしヘル・パステル A・オレンジ[pale Peate] Orange(41c)	"
オート・ミール地植え (15P地植え5)※※	中程度ないし良好	オレンジ・ルセツト[Orange Rust(4pe)]ないし ルセツト・オレンジ[Russet Orange(4pc)]	"
イースト・エクス・エクス・エクス地植え (15P地植え2)※※	"	メイプル(Maple(41a))ないしルグザン・タン [Luggage Tan(4re)]	メイプル(41a)ないしライト・ ブラウン[Light Brown(4ng)]
リンド・酸カルシウム地植え	不良	無 色	なし
銀葉地植え (ワタスマン地植え14)※	僅 少	"	"

- 6 -

ベネット地植え (ワタスマン地植え30)※	中程度ないし良好	メイプル(41a)ないしルグザン・タン(4re)	メイプル(41a)ないしライト・ブラウン (4ng)
エマーソン地植え (ワタスマン地植え28)※	中 程 度	パステル・オレンジ(41c)ないしメイプル(41a)	メイプル(41a)
ハイカー・トレスナー地植え (ワタスマン地植え52)※	中程度ないし良好	シナモン(Cinnamon(31a))ないしメイプル (41a)	メイプル(41a)ないしライト・スパイス ・ブラウン[Light Spice Brown (43g)]
グルコース・イースト・エクス地植え (ワタスマン地植え29)※	中 程 度	メロン・イエロー[Melon Yellow(5ga)]	なし
セプトン・イースト・エクス地植え (15P地植え6)※※	僅 少	無 色	"
止観地植え	僅少ないし不良	"	"
ジャガイモ片 (ワタスマン地植え40)※	中 程 度	タイレッド(Tie Red(5ne))ないし銅 [Copper(51c)]	"
ジャガイモ片+炭酸カルシウム	"	"	"
ニンジン片	僅 少	無 色	"

※ Wakeman, S. A: The Actinomyces Vol. 2, 1961 P. 327-334 Williams & Wilkins co.
 ※ Inter. J. Syst. Bact. 16: 513-540 (1966)
 ※ Antimicrob. Agents and Chemother 1965 P. 116-124

- 7 -

〔N〕 生理的性状

生理的性状は下記の通りである。

1) 炭素源の同化性

炭素源	P & G 系	シメダナ
D-アラビノース	+	+
L-アラビノース	+	+
D-フラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	+
D-グルコース	+	+
グリセロール	—	—
L-イノシトール	—	—
D-マンノース	+	+
D-マンニトール	+	+
α-グリビオース	+	+
β-ラクトース	+	+
ズルチン	—	—
D-トレハロース	+	+
D-セロビオース	+	+
メレジット	+	+
ラフィノース	+	—

レーナムノース	+	+
D-リボース	—	—
L-ソルビトール	—	—
D-ソルビトール	+	+
シクロロース	+	+
D-キシロース	+	+
アドハート	—	—
ゼリシン	± ~ +	± ~ +
ステーチ	+	+
マルトース	+	+
デキストリン	+	+
イヌリン	—	—

+: 陽性, ±: 疑陽性, —: 陰性

※: アリドハム・ゴツトリープの無菌地

※※: Inter. J. Syst. Bact., 21: 240-247 (1971) によるルエドマンの有様地

2) 生育温度範囲: 20~40℃

3) 脱脂牛乳: ペプトン化および凝固とともに陽性

— 8 —

— 9 —

4) メラニン様色素の生成: 陽性 (チロシンおよびペプトン・イーストエキスを鉄寒天培地上)

5) ステーチの加水分解: 陽性

6) セルロースの分解: 陽性

7) カゼインの分解: 陽性

8) チロシンの分解: 陽性

9) セラチンの消化: 陽性

10) 硝化水素の生成: 弱い陽性

11) 硝化塩の還元: 陽性

12) 生育 pH: pH 5.5~9.0

上記の通り、本菌 G 367 の特徴としては、基生菌糸に指形の胞子のうを発生し、胞子のう中に胞子が丸で一列にならび、胞子に環状の鞭毛を有していることにある。

このように、胞子のうを形成し、その中に鞭毛を有する胞子を形成するものは、アチノプラズマ科 (Actinoplasmaceae) に属するものであつて、胞子のうが指形で、その中に丸で一列に胞子が形成されるものは、ダクタロスポランジウム属に属する。

さらに、本菌 G 367 株は有鞭地培上で、基生菌糸が柱状色ないし褐色を呈し、褐色の可溶性色素を生ずる特徴を有することより、ダクタロスポランジウム・タイランゲンセ (*Dactyloporangium thailandense*) [Arch. Microbiol. 58: 42-52 (1967)] に属するものと同定した。

よつて、本菌 G 367 を、ダクタロスポランジウム・タイランゲンセ G 367 と命名したもので、また本菌は工業技術院微生物工学研究所に「申請受照番号 4840 号」として申請されている。

本発明は上記の知見に基いて完成されたもので、ダクタロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシン G1a 生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシン G1a を採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシン G1a の製造法である。

また本発明を実施するに当り使用されるダクタロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシン G1a (以下単に、ゲンタミシン G1a という) の

— 10 —

— 11 —

生産菌としては、上記のダクタロスポランジウム・タイランデンセ G367株がその一例として挙げられるもので、また本発明の使用菌はこれに限定されるものでなく、ダクタロスポランジウム属に属するゲンタミシンC1a生産菌であればよく、天然または変異株も使用し得る。

次いで、本発明のゲンタミシンC1aを製造するに当たって例示すれば、上記のダクタロスポランジウム属に属するゲンタミシンC1a生産菌を通常の微生物の培養に使用する培地成分を含む培地にて好気的に培養することによつて得られる。培地としては、固形培地または液体培地が用いられるが、特に大量生産のためには液体培地、特に水性培地が適当である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては同化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュクロース、マルトース、スターチ、デキストリン、モロツセなどが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、

- 12 -

例えばコーン・スターチ、リカー、大豆卵、綿実粉、小麦グルテン、ペプチン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、アンモニウム塩、磷酸塩などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの添加が必要に応じて使用される。

培養期間が過ぎが過ぎ、ゲンタミシンC1aを生産する範囲内で適宜変更し得るが、特に好ましくは25〜35℃である。培養時間は、条件によつて多少異なるが、通常100〜200時間程度であつて、ゲンタミシンC1aが最大力価に達する時期を見計つて適当な時期に培養を終了すればよい。

このようにして得られたゲンタミシンC1a生産菌の液体培養の培養物中において、ゲンタミシンC1aは液体部分に大部分産生されている。

次いでこのゲンタミシンC1a生産菌の培養物からゲンタミシンC1aを採取するのであるが、ゲンタミシンC1aは水溶性の塩基性アミノ糖化合物であることを利用して分離精製を行なうことが簡便

- 13 -

である。また生産されたゲンタミシンC1aはバクルス・ズブリスPCI219を担体として、通常の懸濁法により活性成分の回収、および定量化を行なつたものである。

ゲンタミシンC1aの分離精製手段の一例を示す次の通りである。すなわちゲンタミシンC1a生産菌を前述の如く培養して得られる培養物から固形分を除去して培養液を得るのであるが、ゲンタミシンC1aがアミノ糖化合物であるためにその培養物のpHを一時的に調整し、これを中和して蒸留してその培養液を得ることが好ましく、次いでこの培養液を降イオン交換樹脂例えばアンバーライトIRC-50(NH₄⁺型)のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、これにより活性成分を2Nアンモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を蒸留した後、そのpHを調整し、降イオン交換樹脂例えばCM-セファックスC-25(NH₄⁺型)のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、0〜0.55Nの濃度勾配をもたせたアンモニア水にて溶出せしめ、その活性成分を

- 14 -

得、これを減圧濃縮し、凍結乾燥することによりゲンタミシンC1aの精製白色粉末を溶解塩の型にて得られる。またこのようにして得られるゲンタミシンC1aは薄層クロマトグラフィーにてスポットを示すものであることが簡便に示し得る。

次いでこのようにして得られた本発明のゲンタミシンC1aの物理化学的性状を挙げ次の通りである。

分子量

449(マスマクトルより)

分子式

C₁₀H₂₉N₅O₇

比旋光

[α]_D²⁵ = +9.6.2 (C = 0.39, H₂O)

ペーパクロマトグラフィー

クロロホルム：メタノール：17%アンモニア水(2:1:1) R_F = 0.22
 プロパノール：ピリジン：酢酸：水(6:4:1:3) 上海草 R_F = 0.29
 色性状

- 15 -

白色粉末

上記の性状、さらにマヌベクトルの各ゼータ、核磁共鳴スペクトルなどより、本発明により得られる化合物が、細記の文献記載のゲンタミシンC1aと同一物質であると認定された。

次に本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるものではない。

実施例 1

デキストリン 1 ㎖、グルコース 1 ㎖、カゼイン水解物 0.5 ㎖、酵母エキス 0.5 ㎖、炭酸カルシウム 0.1 ㎖を含有する培地 (PH 7.0) : 100 ml を 500 ml 耐圧三角フラスコに分配し、120℃、20 分間加熱殺菌した。本培地 10 本に、各々 2 ㎖のクロロホルム・タイラントセル 367 株の斜面培養液よりの一白金耳を接種し、30℃、120 時間培養した。次いでこれを上記と同一培地の加熱殺菌した培地 20 ㎖を含有する 50 ㎖シャー・フー・ダンターに移移し、30℃、72 時間、300 rpm、毎分 20 ㎖の無菌空気の

- 16 -

100 ml まで液面満ちた。

次いでこの濃縮液を 6N 炭酸水溶液にて PH 7.0 に調整し、これを、C-M-α フアゲツクス G-25 (ソルマシア・ファイン・ケミカル社製) (NH₄⁺型) 500 ml を充填したカラム (径 4 cm) にテアー・ジして活性物質を吸着せしめた。その洗脱カラムを水洗浄、0.5N の濃度勾配をもたせたアンモニア水 5 ㎖により溶出せしめ、溶出液を 20 ml ずつ分画した。各分画について、クロロホルム : メタノール : 28% アンモニア水 1 : 1 : 1 の下層を脱脂溶媒とした薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリン発色により目的物を確認した。その結果、洗 235 画分より 245 画分がゲンタミシン C1a のみを含有したものであつた。次いでこの画分を回収、合せて液面満ちし、次いで凍結乾燥してゲンタミシン C1a 85% を得た。

製出出人 東洋創造株式会社
代表者 伊東 富士男

- 18 -

特開昭55-156592(6)

条件下で通気液培培養した。次いでデキストリン 5 ㎖、グルコース 0.5 ㎖、炭酸大豆卵 3 ㎖、炭酸カルシウム 0.7 ㎖、塩化コバルト 1.3 ppm を含有する加熱殺菌した培地 (PH 7.2) : 200 ㎖ を含有する 250 ㎖容タンクに上記の培養物 10 ㎖を移殖し、30℃、120 時間、250 rpm、毎分 100 ㎖の無菌空気の条件下で通気液培培養し、培養物約 190 ㎖を得た。

次いで、実施例 2 の如くして、その培養物よりゲンタミシン C1a を分離精製するものである。

実施例 2

実施例 1 で得られた培養物を、12N 炭酸水溶液にて PH 2 に調整し、30 分間攪拌した後、濃アンモニア水にて PH 7.0 に調整し、さらにこれに移送助剤としてパーライト (商品名) 4 ㎖を加えて移送し、次いで得られた培養液を、アンバライト IRC-50 (ローマ・アンド・ハース社製) (NH₄⁺型) 10 ㎖を充填したカラムにテアー・ジし、水洗した後、2N アンモニア水 20 ㎖にて溶出せしめ、その全量出液を得て、これを

- 17 -

特 許 願 正 書

昭和 55 年 7 月 2 日

特許庁長官 川 原 隆 雄 殿

1. 事件の表示

昭和 54 年特許第 6002 / 号

2. 発明の名称

抗生物質ゲンタミシン C1a の製造法

3. 修正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三浦 3-2 の 1

名称 東洋創造株式会社

代表者 伊 東 富 士 男

4. 補正命令の日付

日 期

5. 修正の対案

明細書の発明の要旨に説明の増

6. 修正の内容

明細書第 4 頁第 16 行の

「diaminopimelic」を

「diaminopimelic」と訂正する



同語 / 8 頁第 3 行の

「モファデツタスロ」を

「モツアデツタスロ」と訂正する